



TITLE:

アスパラギン酸残基の異性化によるタンパク質機能の変化に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

坂上, 弘明

CITATION:

坂上, 弘明. アスパラギン酸残基の異性化によるタンパク質機能の変化に関する研究. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-01-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19395>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

京都大学	博 士 (理 学)	氏 名	坂 上 弘 明
論文題目	アスパラギン酸残基の異性化によるタンパク質機能の変化に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>タンパク質を構成するアミノ酸は通常全てL-アミノ酸であるが、近年、白内障やアルツハイマー病などの原因タンパク質中にアスパラギン酸（Asp）残基の異性体が発見されている。申請者は、タンパク質中のAsp残基の異性化がタンパク質の機能に与える影響に着目し、研究を行った。第一部では白内障の水晶体中に生じているAspの異性化が水晶体タンパク質の機能にどのような影響をもたらしているかについて研究した。</p> <p>第二部では Asp異性体を挿入した人工タンパク質の創出を行い、1残基のAspの異性化がタンパク質の機能にどのような影響を及ぼすのかについての研究を行った。</p>			
第一部 ヒト白内障水晶体タンパク質中のアスパラギン酸残基の異性化によるタンパク質間相互作用の変化の解析			
<p>水晶体の透明性はα-、β-、γ-クリスタリンというタンパク質の相互作用によって保持されている。α-クリスタリンには2種のサブユニットが、β-クリスタリンには7種のサブユニットが存在し、タンパク質間相互作用を介して会合体サイズの異なるα-クリスタリンおよびβ-クリスタリンを形成している。γ-クリスタリンにも7種のサブユニットが存在するが、これらは単量体として存在している。本研究では加齢性白内障の水晶体タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーにより、α-、β-、γ-クリスタリン画分に分画し、トリプシン処理後、質量分析を行った。その結果、会合体を形成しているはずのα-クリスタリンサブユニットであるαB-クリスタリンとβ-クリスタリンサブユニットであるβA3-クリスタリンがγ-クリスタリン画分に単量体として溶出していることが明らかとなった。さらに、単量体化したαB-クリスタリンのAsp96、およびβA3-クリスタリンのAsp37が著しくD-体へと異性化していることが明らかとなった。一方で、正常な会合体を形成しているαB-クリスタリンのAsp96、およびβA3-クリスタリンのAsp37は全く異性化していなかった。このことから、Asp残基の異性化は、αB-およびβA3-クリスタリンのタンパク質間相互作用を変化させ、クリスタリンを単量体化させることが初めて明らかとなった。</p>			
第二部 Asp異性体含有タンパク質の合成とその機能解析			
<p>タンパク質発現法とペプチド合成法を組み合わせたExpressed Protein Ligation（EPL）を用いて、Asp異性体含有タンパク質を合成し、Asp残基1残基の異性化によるタンパク質機能の変化を解析した。EPLはDawsonらによって開発されたNative Chemical Ligation（NCL）がもとになっている。NCLはC末端にチオエステルを有するペプチドとN末端に無保護のシステインを持つペプチドを生理的条件下で混合すると、2つのペプチドがペプ</p>			

チド結合を形成して縮合する反応である。EPLは、タンパク質発現法を用いてC末端チオエステルを合成する方法である。本研究では、C末端チオエステルを有するRNase Aの1-109の配列をタンパク質発現法により合成し、N末端システインを有するRNase Aの110-124の配列をペプチド合成法により合成した。ペプチド合成過程において、RNase Aの活性に重要であるAsp121を通常のL α -AspからL β -、D α -、D β -Aspの3つのAsp異性体へと変化させ、EPLに用いることでAsp異性体含有RNase Aを作製した。このようにして合成されたAsp異性体含有RNase Aの活性を測定したところ、L α -Asp を導入したRNase A は活性を保持していたが、L β -、D α -、D β -Asp を導入したRNase Aでは活性が完全に失われることが明らかとなった。この結果からAsp残基がたった1残基異性化するだけで、タンパク質の機能が劇的に変化することが初めて明らかとなった。

(論文審査結果の要旨)

タンパク質はL-アミノ酸のみで構成されているが、白内障やアルツハイマー病などの原因タンパク質中にはD-アスパラギン酸 (Asp) が多く蓄積していることが明らかとなっている。D-AspはL-Asp残基がスクシンイミド中間体を經由して生じる異性化反応の結果であり、D-体と同時に β -体も生じるため、Asp異性体にはL α -Asp, L β -Asp, D α -Asp, D β -Aspの4種類が存在する。本反応は生体内のような温和な条件下でも生じやすい非酵素的な化学的反応であるため、老化の分子マーカーとも考えられている。このような異性体の出現はタンパク質の構造や機能に何らかの影響を与えると考えられるが、その影響を直接的に解析した研究はない。

申請者は本研究の第一部で、加齢性白内障の水晶体中のクリスタリン中のAsp残基の異性化が及ぼす機能変化について検討した。その結果、 α B-クリスタリンのAsp96と、 β A3-クリスタリンのAsp37がD-体へと異性化することにより、本来会合体を形成しているはずのこれらクリスタリンがモノマーへと解離していることを見出した。

Asp残基の異性化の影響を直接検討するためにはAsp異性体を任意の部位に導入した変異型タンパク質を作成し、野生型タンパク質とその機能を比較すればよい。しかしながら、組換えDNA技術を利用したタンパク質発現法では、タンパク質中に非天然アミノ酸であるAsp異性体を導入する事は出来ない。化学合成法では任意の部位にAsp異性体を導入することができるが、100残基以上のアミノ酸を化学合成することは困難である。このため、Asp異性体含有タンパク質が作成された研究はこれまでになかった。申請者はこの問題を克服するため、タンパク質発現法とペプチド合成法を組み合わせたExpressed Protein Ligation (EPL) を用いて、RNase Aの活性部位であるAsp121に4種類のAsp異性体を挿入したタンパク質の合成に世界で初めて成功した(第二部)。これらを用いてRNase A の活性を測定したところ、L α -Asp を導入したRNase A は活性を保持していたが、L β -、D α -、D β -Asp を導入したRNase Aでは活性が完全に失われた。この結果からAsp残基が

たった1残基異性化するだけで、酵素活性が劇的に変化することが初めて明らかとなった。

以上、本論文では、白内障水晶体を用いたin vivoの系およびAsp異性体を人工的に導入して合成したRNase Aを用いたin vitroの系の両面からAsp異性体がタンパク質に及ぼす影響についての検討を行った。特にアミノ酸の異性体を導入した人工タンパク質の創出は世界で初めての独創的研究であり、学術的価値が高い。第一部、第二部の両面からの検討により、タンパク質中のAsp残基がたった1残基異性化することにより、タンパク質の機能が劇的に変化することを明らかにした。その波及効果は老化の基礎研究のみならず、広く生命科学の分野にも及ぶと考えられる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成27年11月16日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降